台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(4):333–342 (2023)
https://doi.org/10.6156/JTAR.202312_72(4).0004

研究報告

探討基因轉殖水稻稻稈殘體對土壤微生物相的影響

關政平 [1]　江瑩娟 [2]　蕭崇仁 [2]　曾清山 [1,*]

摘要

關政平、江瑩娟、蕭崇仁、曾清山。2023。探討基因轉殖水稻稻稈殘體對土壤微生物相的影響。台灣農業研究 72(4):333–342。

為瞭解過量表達植酸酵素之轉殖水稻 (AAN) 稻稈殘體掩埋土中後，對土壤微生物相之影響，本研究進行為期 1 年的監測，追蹤掩埋期間土壤微生物相的變化。結果顯示稻稈殘體經 180 d 掩埋，對照品種非轉殖 ‘TNG 67’ (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Tainung 67; ‘TNG 67’) 水稻掩埋土壤中的總細菌數，顯著高於 AAN 轉殖系，隨著時間增加，兩者之總細菌數皆有下降趨勢。土壤總真菌數隨著掩埋時間而變化較大，雖然皆以 AAN 轉殖系較高，但 120 d 後與 ‘TNG 67’ 相較兩者差異不顯著，且 AAN 轉殖系的總真菌數在 360 d 時有較明顯之下降。土壤放射線菌數方面，‘TNG 67’ 對照水稻隨著時間緩慢上升，AAN 轉殖系則在 120 d 後菌數才明顯增加，且兩者皆在 300 d 之後開始下降，至 360 d 時二者無顯著差異。使用變性梯度膠體電泳分析，結果顯示 AAN 轉殖系周邊土壤菌相數量增加，在 180 d 時 AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 水稻之細菌菌群相似度高同屬一群；在 360 d 時 AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 之細菌菌群亦顯示同屬一群。綜合平板計算法與變性梯度膠體電泳模式之結果，推測在殘體掩埋初期，AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 之殘體，在土壤中之微生物數量與細菌多樣性方面有較高之差異性，但這些差異在掩埋達 360 d 後逐漸減少並趨向一致。

關鍵詞：水稻、基因轉殖作物、土壤微生物、稻稈。

前言

自 1996 年基因轉殖作物商業化種植以來，隨著轉殖技術日漸成熟，不論作物種類、栽培面積及種植國家皆逐年增加，然而各界對於轉殖作物與其產物在人畜食用安全性、基因污染及其他層面的生態環境安全問題仍存有疑慮，亟需在產業化生產前，進行相關的科學評估與安全研究，才能將轉殖作物對生態環境可能造成的風險降至最低 (Chandler & Dunwell 2008)。水稻是世界上最重要的糧食作物之一，提供全球人類 23% 的糧食供給 (Fischer *et al*. 2000)。利用基因轉殖技術培育而成的轉殖水稻逐漸增加，已經有許多基因成功的轉入水稻品種中，如抗病蟲害，抗病毒、抗除草劑、耐旱及耐鹽等特性 (Hu *et al*. 2006; Kumar *et al*. 2008)，為糧食生產提供更多元的選擇與保障。

土壤微生物是土壤重要組成成分之一，參與有機質分解、固氮及硝化等作用，在養分循環中扮演極重要的角色。因此，維持土壤微生物群落組成的多樣性，有助於維持土壤團粒結構，並對環境生態系統有正面影響。但土壤微生物群落易受到氣候、環境與耕作模式及農業化學藥品使用的影響，甚至栽培作物之種類都可能造成土壤微生物相組成的改變 (Castaldini *et al*. 2005; Liu *et al*. 2006)。基因轉殖作物的外源基因與基因表達產物，可通過根系分泌物或其殘體進入土壤生態系統，其中根系釋放碳化合物數量與種類的不同，將導致微生物群落

投稿日期：2023 年 7 月 25 日；接受日期：2023 年 10 月 6 日。
[*] 通訊作者：samtseng@tari.gov.tw
[1] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

在利用與使用效率的不同 (Fang *et al*. 2005)。過去分析抗輪點病毒 (papaya ringspot virus; PRSV) 轉殖木瓜與同源性非轉殖木瓜種植之土壤微生物相的研究，結果顯示溶磷細菌、蛋白分解菌、總細菌及真菌族群數目，隨種植時間而互有消長 (Liu *et al*. 2006)。

土壤環境中僅有約 20% 的細菌能被分離並鑑定，使用一般或選擇性培養基鑑別菌種，無法精確的模擬特定菌種在原始環境中增生所需的養分，因此傳統的培養方法往往無法得到正確的環境菌相 (Wayne *et al*. 1987)。隨著分子生物技術的快速進步，有更多土壤微生物分析的方法可以選擇，提供我們對原始土壤環境中菌種的組成有更深入的瞭解 (Muyzer *et al*. 1993)。16S rDNA 為原核生物轉譯出核糖體的一段基因，可作細菌類緣演化關係的標記物質 (Fox *et al*. 1980)，而且這段基因在原核生物間具有高度的保留性，在菌種間亦具有差異性 (Woese 1987)，利用這些差異可用來鑑定不同的菌種。聚合酶連鎖反應暨變性梯度膠體電泳分析 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis; PCR-DGGE) 是以 16S rDNA 在菌種間具有差異現象為基礎所發展出的方法，為檢測片段 DNA 內單一鹼基改變之電泳法，其準確度可達到 98% 以上，其中鑑別突變株的能力遠比直接定序來的高且敏銳 (Trülzsch *et al*. 1999)，此方法在結合統計分析法後成為快速分析樣本微生物組成變化的方法。DGGE 圖譜上不同條帶分別代表不同菌種 (Muyzer *et al*. 1993)，條帶的亮度與 DNA 濃度具有正比關係，條帶的粗細則可代表菌種含量的多寡，具有半定量與半定性的作用，因此 DGGE 可作為評估微生物菌相組成的方法。目前 DGGE 技術在微生物領域上的應用，包括分析微生物族群組成的多樣性 (Nübel *et al*. 1999)、族群組成之動態研究 (Watanabe *et al*. 1998) 及協助分離環境中不易培養的菌種與微生物群落中優勢菌種之相關性等 (Palys *et al*. 1997)。利用此一技術分析環境中的微生物種類，不僅能克服傳統菌種培養技術無法培養環境中大部分微生物的缺點，更縮短了研究時間，因而此法被廣泛運用在分析環境微生物菌相與生態的研究上。

為瞭解轉殖水稻其遺傳物質在環境中的殘存性，是否對土壤微生物造成影響，本研究利用平板計數法與 PCR-DGGE，分析轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 與其未轉殖「台農 67 號」(‘TNG 67’) 水稻殘體，於田間一年期間自然分解情況下，對土壤中微生物群相之影響，並以此作為轉殖植酸酵素水稻對非目標微生物影響之安全性評估判斷依據。

材料與方法

水稻根圈土壤採樣

本試驗依據農業部農業試驗所『基因轉殖植物田間試驗作業管理規範』執行。所使用之材料係由中央研究院余淑美研究員提供之轉殖植酸酵素水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*; AAN)，以及其非基因轉殖水稻受體品種「台農 67 號」(*O. sativa* L. ssp. *japonica* cv. Tainung 67; ‘TNG 67’) (Hong *et al*. 2004)。AAN 轉殖系與其非轉殖 ‘TNG 67’ 水稻除了外源基因外，其他的遺傳背景幾乎完全一致。取 AAN 轉殖系與非轉殖 ‘TNG 67’ 葉片，以45℃烘乾至恆重，秤取 18 g 乾重，裝入 10 × 15 cm 尼龍網袋 (1 mm 孔徑) 後束口，分別埋入土中 10 cm 深。田間配置採完全隨機設計共 5 重複。取樣位置包含 AAN 轉殖系、未轉殖 ‘TNG 67’ 以及沒有植物根系穿越的當作對照用土壤 (blank soil)。試驗材料埋入時間為 1 年 (掩埋時間為 2020 年 10 月至 2021 年 10 月)，取樣時間為埋入土中後每 2 個月取樣 1 次，總計 6 個取樣時間。取樣位置為採集尼龍網袋周邊土壤 100 g，以粗篩網過濾去除植物殘體與碎石後於室溫下陰乾備用，作為後續微生物群落檢測之用。

土壤微生物群落分析── 平板計數法

秤取 0.5 g 土壤樣品，經室溫風乾後低溫保存 (Wei *et al*. 2006)，加入 49.5 mL 之 0.2% 洋菜培養基，室溫下震盪 30 min 進行土壤微生物萃取，待土壤顆粒自然沉降後，取上層液並以 0.85% NaCl 進行序列稀釋。以選擇性培養基平板計數法偵測總細菌菌數 (total bacteria)、總真菌菌數 (total fungi) 及放線菌菌數 (Actinomycete)。細菌與真菌之選擇性

培養基配方如 Mislivec *et al*. (1992) 所述；放線菌選擇性培養基配方為 Kenknight and Munaier's medium，並添加抗生素 streptomycin (0.025 mg mL^{-1}) 與抗真菌劑 cycloheximide (50 μg mL^{-1}) 以分別抑制細菌與真菌生長；上述不同之選擇性培養基中分別加入 100 μL 之 10^3 稀釋液，以 L 型玻璃棒將菌液塗布均勻，每種選擇性培養基試驗進行 3 重複。所有培養基在配製完成後皆以滅菌釜 121℃、1.2 kg cm^{-2}、15 min 條件滅菌。細菌置於 37℃烘箱培養 3 d (Wu *et al*. 2024)；真菌置於 25–28℃培養 3 d (Wu *et al*. 2024)；放射線菌置於 28–30℃烘箱培養 3 d (Nazari *et al*. 2022)，並逐日觀察記錄上述微生物族群菌落數。

土壤 DNA 萃取

使用 DNeasy® PowerSoil® Kit (MO BIO, QIAGEN, Carlsbad, CA, USA)，取適量土壤加入 PowerBead Tube 中，加入 60 μL Solution C1 上下顛倒混合均勻，再將離心管平放至震盪機上震盪 10 min，離心 10,000× *g*、30 s，取 500 μL 上清液至 2 mL Collection Tube 中，加入 250 μL Solution C2，震盪數秒混合均勻，插入冰上 5 min，離心 10,000× *g*、1 min，取 600 μL 上清液至 2 mL Collection Tube 中，加入 200 μL Solution C3，震盪數秒混合均勻，插入冰上 5 min，離心 10,000× *g*、1 min，取 700 μL 上清液至 2 mL Collection tube 中，加入 1,200 μL Solution C4，震盪數秒混合均勻，取 675 μL 混合液至 Spin Filter，離心 10,000× *g*、1 min，去除上清液 (此步驟重複數次至混合液完全過完 Spin Filter)，加入 500 μL Solution C5 離心 10,000× *g*、30 s，去除上清液再離心 1 次，加入 30 μL diethyl pyrocarbonate (DEPC) water，離心 10,000× *g*、1 min，即可得到萃取之土壤微生物 DNA。

聚合酶連鎖反應 (PCR)

針對細菌之 16S rDNA 基因為依據 (Nübel *et al*. 1999)，使用引子為：968F-GC (5′-CGC-CCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGG-CACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3′) 與 1401-R (5′-CGGTGTGTACAAGACCC-3′)，PCR 反應條件為 100 ng DNA、10× buffer 5 μL、2 mM dNTP 5 μL、2.5 mM $MgSO_4$ 2 μL、968GC-F 1 μL、1401-R 1 μL、kinetic outlier detection (KOD) 1 μL (1.0 U μL^{-1}, TOYOBO, Osaka, Japan)，最後以 DEPC water 補至最終體積為 50 μL。PCR 條件如下：95℃、5 min，再以 95℃、30 s，56℃、45 s，72℃、45 s (35 cycle)，再經 72℃、5 min 進行最後延長期 (extension)，最後取 3 μL 之 PCR 產物進行 2% 膠體電泳確認 DNA 產量，之後再進行變性梯度膠體電泳分析。

變性梯度膠體電泳 (DGGE)

變性梯度膠體電泳是以 Bio-Rad 公司 (Hercules, CA, USA) Model 475 Gradient Delivery System 作為製作膠片的設備。配製 6% polyacrylamide 的凝膠 (base pair separation: 300–1,000 bp)，凝膠之中變性梯度為 40–60% (urea formamide) (100% 變性劑含有 7 M urea 與 40% (vol/vol) formamide)。將 PCR 的產物進行定量與固定體積，加入變性梯度膠體中，進行變性梯度膠體電泳。電泳環境為 1× TAE buffer、60℃，電壓為 65 V、15 h，膠片以 SYBR GOLD 染色後利用軟體進行影像分析。

圖譜影像分析

將變性梯度膠體電泳圖影像，利用 Bio-Rad 公司的軟體 Quantity One Version 4.6 進行 DGGE 電泳圖上條帶影像的定位與統計分析。再以 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 群聚分析方法，根據相似性係數繪製出親緣樹狀圖。

統計分析方法

基改與非基改水稻處理之土壤微生物相似性利用 SAS EG 統計分析軟體 (version 2006, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)，估算基改與非基改不同土壤微生物族群間的差異性。

結果

本試驗分析不同採樣時間之掩埋水稻土壤樣品，評估 AAN 轉殖系與非轉殖 'TNG 67' 之殘體對土壤微生物造成之短期影響。試驗結果

顯示，AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 水稻殘體在初期第 0–4 個月，三組處理之土壤可培養總細菌數變化不大，但以 ‘TNG 67’ 較其他兩組為低 (圖 1)，第 6 個月後開始有明顯變化，‘TNG 67’ 的可培養總細菌數顯著高於 AAN 轉殖系；第 10–12 個月隨著時間增加而有下降趨勢。

土壤可培養總真菌數隨著水稻殘體分解時間增加而變化較大，在第 2 個月時 AAN 轉殖系的可培養總真菌數顯著高於非轉殖 ‘TNG 67’ (圖 2)，並隨著時間增加而有上下波動的趨勢；在第 6 個月開始，AAN 轉殖系的可培養總真菌數隨殘體分解時間增加而下降；在第 12 個月時 AAN 轉殖系的可培養總真菌數降至最低。非轉殖 ‘TNG 67’ 與無水稻殘體對照組的變化，在第 4 個月後趨勢一致，皆在第 6 個月達到最高後逐漸下降，在第 10 個月後緩慢上升。土壤可培養放射線菌數隨著 AAN 水稻殘體分解由前期至第 4 個月後菌數逐漸增加上升趨勢，在第 8 個月時達到最高，AAN 轉殖系的可培養放射線菌數顯著高於非轉殖 ‘TNG 67’，於第 10 個月之後開始明顯下降，於第 12 個月時二者無顯著差異 (圖 3)。

土壤 DNA 樣品進行 PCR 放大反應後，經

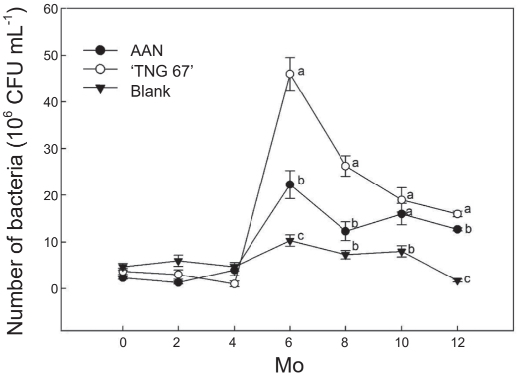

圖 1.　水稻殘體在不同時期的土壤總細菌數。採樣土壤包括 AAN：植酸酵素水稻殘體；‘TNG 67’：非轉殖 ‘TNG 67’ 水稻殘體；CK：無水稻殘體。

Fig. 1.　Total bacterial counts in the soil at different stages of rice straw residues. AAN: transgenic AAN; ‘TNG 67’: non-transgenic ‘TNG 67’; and CK: blank soil. Error bars represent standard error. Values with a different letter are significantly different from each other ($P < 0.05$).

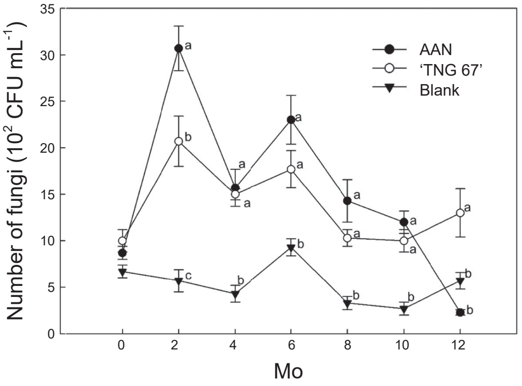

圖 2.　水稻殘體在不同時期的土壤總真菌數。採樣土壤包括 AAN：植酸酵素水稻殘體；‘TNG 67’：非轉殖 ‘TNG 67’ 水稻殘體；CK：無水稻殘體。

Fig. 2.　Total fungal counts in the soil at different stages of rice straw residues. AAN: transgenic AAN; ‘TNG 67’: non-transgenic ‘TNG 67’; and CK: blank soil. Error bars represent standard error. Values with a different letter are significantly different from each other ($P < 0.05$).

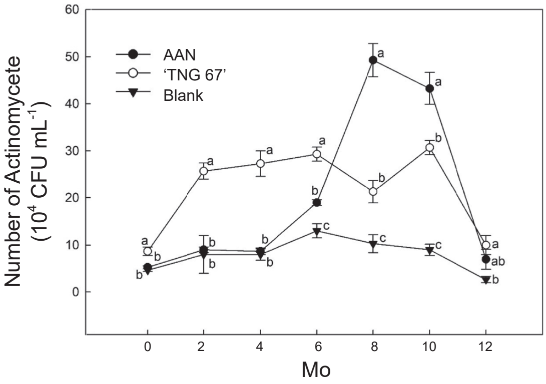

圖 3.　水稻殘體在不同時期的土壤總放射線菌數。採樣土壤包括 AAN：植酸酵素水稻殘體；‘TNG 67’：非轉殖 ‘TNG 67’ 水稻殘體；CK：無水稻殘體。

Fig. 3.　Total actinomycete counts in the soil at different stages of rice straw residues. AAN: transgenic AAN; ‘TNG 67’: non-transgenic ‘TNG 67’; and CK: blank soil. Error bars represent standard error. Values with a different letter are significantly different from each other ($P < 0.05$).

DGGE 之分析結果，顯示如圖 4。尿素 (urea) 與甲醯胺 (formamide) 所組成的變性劑在變性濃度 40–60% 下，膠體濃度 6% polyacrylamide，以垂直變性梯度膠體進行測試。由 DGGE 結果經由 UPGMA 分析，顯示在 180 d

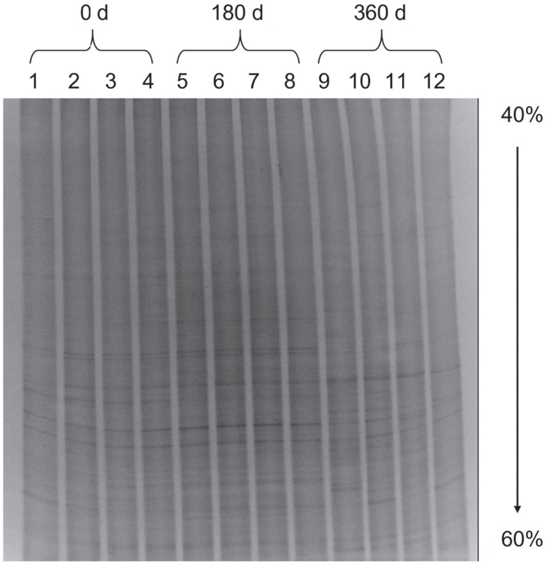

圖 4. 從轉基因 AAN 與 'TNG 67' 稻稈殘體土壤中擴增得到的細菌 16S rDNA 片段的 DGGE 圖。行 1、5、9：'TNG 67'-1 水稻殘體土樣 (Day 0、Day 180、Day 360)；行 2、6、10：AAN-1 轉殖系殘體土樣 (Day 0、Day 180、Day 360)；行 3、7、11：'TNG 67'-2 水稻殘體土樣 (Day 0、Day 180、Day 360)；行 4、8、12: AAN-2 轉殖系殘體土樣 (Day 0、Day 180、Day 360)。

Fig. 4. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of bacterial 16S rDNA fragments amplified from soil samples containing transgenic AAN and 'TNG 67' rice straw residues. Lane 1, 5, 9: soil of 'TNG 67' (Day 0, Day 180, Day 360); Lane 2, 6, 10: soil of AAN line (Day 0, Day 180, Day 360); Lane 3, 7, 11: soil of 'TNG 67' (Day 0, Day 180, Day 360); and Lane 4, 8, 12: AAN soil of AAN line (Day 0, Day 180, Day 360).

之 AAN 轉殖系與非轉殖 'TNG 67' 水稻細菌群相似同屬一群，相似度達 0.80–0.86，在 360 d 顯示分成 2 個菌群：其中一個菌群顯示非轉殖 'TNG 67' 水稻與 AAN 轉殖系之細菌族群屬同一細菌群，族群相似度達 0.70；另一菌群則顯示 AAN 360 d 與 AAN 0 d 之細菌族群相似度為 0.75 (圖 5)。由以上結果推測，AAN 轉殖系殘體經掩埋處理後對土壤微生物相之影響與 'TNG 67' 水稻相似。

討論

由於稻米生產後殘株作為可利用與可再生物質來源，經常被應用於農業肥料之碳循環再利用。過去農民習慣於稻穀收穫後以燒燬方式來處理稻草，但燃燒時的高溫會破壞表土微生物相，且稻草灰會造成過多碳酸鉀與氧化鈣致土壤酸化與肥力不均情形，而產生的濃煙與粒狀污染物亦會污染空氣。另一種再利用方式則是將收穫後之稻草切碎拌入土中，使稻草回歸農地以增加有機質與礦物質含量，目前已成為處理稻草的常用方式。本試驗藉由稻稈掩埋處理，應用平板計數法與 DGGE 技術觀察一年期間掩埋之植株殘體對周遭土壤微生物種類與數量消長之影響。稻稈之主成分包括纖維素、半纖維素及木質素 (Wu *et al*. 2014; Pan *et al*. 2017)，其中以半纖維素分解率最高，其次為纖維素，分解速率最慢者為木質素 (Gong *et al*. 2018)。透過微生物協同作用，複雜的有機化合物逐漸降解為較小的分子，然後可以提供微生物細胞加以吸收利用 (Eremeeva *et al*. 2001; Pan *et al*. 2010; Wu *et al*. 2014)。本試驗對水稻殘體掩埋之周邊土壤微生物進行 12 個月的監測，藉以瞭解水稻殘體分解與微生物動態變化情形。

本研究結果顯示土壤可培養總菌數包括：總細菌數、總真菌數及放射線菌數隨分解時間增加，而有不同的變化，但 AAN、'TNG 67' 及無殘體對照組的變化趨勢大體是一致的，這現象與學者在稻稈或是甘蔗莖葉之試驗中，顯示殘體分解效率主要受到季節因素影響的結論相同 (Fores *et al*. 1988; Ferreira *et al*. 2015)。但是，關於水稻的生理營養，影響到其纖維成分，進而影響稻稈分解的研究，目前仍十分缺乏。稻稈於土壤中分解受多種外在因素影響，例如溫度、濕度及培養時間與土壤微生物消長有關 (Nakajima *et al*. 2016)。稻稈殘體放入土壤後，藉由土壤微生物活性與酶作用，會經歷很長一段複雜分解過程 (Nakajima *et al*. 2016)。本研究顯示，細菌數在第 0–4 個月與第 8–12 個月較低，可能與初期時間不足及低溫環境下微生物生長受抑制所致。細菌數在第 4 至第 8 個月逐漸升高，推測與春、夏二季溫度與充足的降雨促進了稻稈分解有關。真菌數量則顯示在第 0–4 個月與第 4–8 個月間，

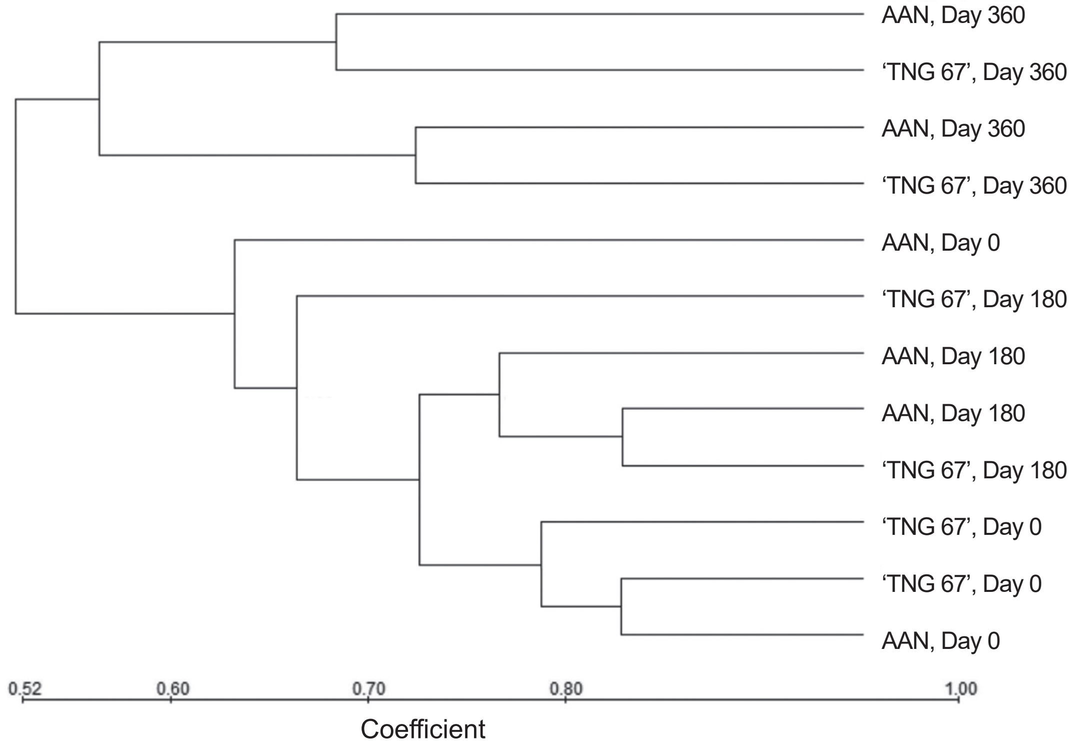

圖 5. 從轉基因 AAN 與 'TNG 67' 稻稈殘體土壤中擴增的 16S rDNA 片段之間的親緣關係樹。

Fig. 5. Phylogenetic tree depicting the relationship between 16S rDNA fragments amplified from soil samples containing transgenic AAN and 'TNG 67' rice straw residues.

AAN 轉殖系與 'TNG 67' 菌數皆有明顯上升再下降趨勢，隨後並逐漸降低。Ferreira *et al.* (2015) 研究甘蔗莖葉殘體的整體分解，認為殘體分解具有初期反應較快，後期反應趨緩的趨勢。在植物殘體分解研究，Ghidey & Alberts (1993) 認為可能由於一些較易分解物質先被微生物分解並逐漸被消耗，造成植物殘體在土壤中釋放分解物質經歷相對較快，但隨後減慢之過程。綜上這些現象與我們研究數據觀察放線菌在第 6–10 個月，AAN 轉殖系菌數明顯增加，但在第 10 個月之菌群數下降趨勢相似。本試驗同時監測放線菌的生長動態，主要是因為有文獻指出放線菌對於掩埋形成堆肥格外重要，這類具有分解纖維素能力之放線菌例如：嗜熱纖維素降解熱鏈黴菌、鏈黴菌或 *Thermomonospora curvata* 等常存在於乾燥溫暖的土地、高鹽濃度及 pH 值是鹼性的土壤 (Stutzenberger 1972)。本試驗定期觀測真菌、細菌及放線菌這 3 種微生物之消長，由於這類具有纖維素分解能力菌在自然界中無處不在。在適當的條件下，微生物會分解纖維素，因此許多菌株皆能溶解與分解改變木質素纖維素等結構。這類微生物通常藉由分泌一系列細胞外酶表現其代謝能力。本研究之結果顯示雖然真菌、細菌及放線菌在掩埋過程中的作用在各時期菌量多寡不相同，且真菌、細菌及放線菌 3 種菌增幅或減少趨勢亦有些不相同，但自然界的碳氮循環係藉由混合多種微生物同時作用而達成，這也顯示微生物間存在協同作用而達成，例如達成木質纖維素之降解，但每種菌之消長與生長力大不相同 (Kanotra & Mathur 1994)，這與我們觀察總細菌數、總真菌數及放射線菌數在相同時間下，顯示不同消長之變化的結果吻合。

儘管水稻殘體分解容易受季節溫、濕度等理化環境影響而變化，微生物群落的組成與菌

量也會造成差異。稻稈殘體在經半年與一年的掩埋處理，這中間歷經不同季節包括乾季、雨季及溫濕度變化等，皆可能影響土壤微生物之分解能力，Jusoh *et al*. (2013) 提到土壤酸鹼值、溫度及碳氮比等皆可能影響殘體堆肥的效果。本研究顯示 0 d 時 ‘TNG 67’ 與 AAN 轉殖系之微生物群落相似度無明顯差異，當達到 180 d 時，AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 微生物群落相似度高，屬於同一菌群 (相似度係數達 0.80–0.86)，亦即在掩埋後期階段，如 360 d 時，AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 之間微生物群落相似度屬與同一分群共 2 菌群皆屬同菌群。AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 經由 DNA 指紋之 DGGE 電泳分析皆屬於同一分群結果，分成不同菌群雖顯示二菌群之間具有些微歧異度，但推測這可能與植物殘體之土壤掩埋深度、與土壤接觸表面積及採樣不均有關。

本研究使用 PCR-DGGE 方法分析水稻桿殘體分解後土壤微生物，特點為不需經過培養，可直接由膠體上提供的資訊得知菌種之多樣性 (Muyzer *et al*. 1993)。由本研究之結果顯示，土壤微生物菌群以 V6–V8 區域為目標引子，在變性劑濃度為 40–60% 間可完全分離，並由 DGGE 圖譜中發現，以 AAN 轉殖系周邊土壤與 ‘TNG 67’ 之條帶相似，顯示細菌菌落屬於同一群菌相，亦即不同水稻殘體或遺傳物質對微生物影響程度不大。由平板計數法結果顯示，達 180 d 時 ‘TNG 67’ 處理之土壤菌數較 AAN 處理之土壤菌數為高，但達 360 d 時菌數趨近相似。DGGE 技術分析殘株掩埋土壤顯示，達 180 d 時 AAN 及 ‘TNG 67’ 維持高相似性係數，而達 360 d 時 AAN 及 ‘TNG 67’ 二者相似度稍微降低，但仍屬同一個微生物菌群關係。

由結果平板計數可大略得知菌相變化趨勢，雖然僅限知道可培養微生物之情形，但輔助使用 DGGE 分析更能知道大多數菌相實際的變化與增減，由結果顯示添加外源基因產物對土壤微生物活性或土壤中累積的外源基因產物，並未造成微生物菌群組成的改變。綜合上述，平板計數量測微生物結果雖僅限於觀測可培養微生物，且這些以人工培養分離所得的微生物受限於培養基與培養條件所分離的微生物種類與數量僅占估計量的 1% (Amann & Lugdwig 2000; Ghazanfar *et al*. 2010)，但仍適合應用在研究菌落族群消長變化上；相較於 DGGE 結果，由於涵蓋更廣泛的微生物多樣性與種類，對於前後不同時期菌相變化，在比較 180 d 與 360 d 時，AAN 與 ‘TNG 67’ 兩者仍具有高相似度關係。整體而言，AAN 轉殖系與 ‘TNG 67’ 在掩埋處理半年與一年之間其土壤微生物菌群大多落在同一群，且相似度高，顯示二者的殘體對土壤微生物族群之組成並未造成明顯差異。

誌謝

本研究承農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組夏奇鋸研究員協助校稿與提供意見得以完成本文，特申謝忱。

引用文獻

Amann, R. and W. Ludwig. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. 24:555–565. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00557.x

Castaldini, M., A. Turrini, C. Sbrana, A. Benedetti, M. Marchionni, S. Mocali, A. Fabiani, S. Landi, F. Santomassimo, B. Pietrangeli, M. P. Nuti, N. Miclaus, and M. Giovannetti. 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 71:6719–6729. doi:10.1128/aem.71.11.6719-6729.2005

Chandler, S. and J. M. Dunwell. 2008. Gene flow, risk assessment and the environmental release of transgenic plants. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 27:25–49. doi:10.1080/07352680802053916

Eremeeva, M. E., G. A. Dasch, and D. J. Silverman. 2001. Quantitative analyses of variations in the injury of endothelial cells elicited by 11 isolates of Rickettsia rickettsii. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:788–796. doi:10.1128/CDLI.8.4.788-796.2001

Fang, M., R. J. Kremer, P. P. Motavalli, and G. Davis. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. Appl. Environ. Microbiol. 71:4132–4136. doi:10.1128/aem.71.7.4132–4136.2005

Ferreira, D. A., H. C. J. Franco, R. Otto, A. C. Vitti, C. Fortes, C. E. Faroni, A. L. Garside, and P. C. O.

Trivelin. 2015. Contribution of N from green harvest residues for sugarcane nutrition in Brazil. Glob. Change Biol. Bioenergy 8:859–866. doi:10.1111/gcbb.12292

Fischer, K. S., J. Barton, G. S. Khush, H. Leung, and R. Cantrell. 2000. Collaborations in rice. Science 290:279–280. doi:10.1126/science.290.5490.279

Fores, E., M. Menendez, and F. A. Comin. 1988. Rice straw decomposition in rice-field soil. Plant Soil 109:145–146. doi:10.1007/BF02197596

Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen, and C. R. Woese. 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science 209:457–463. doi:10.1126/science.6771870

Ghazanfar, S., A. Azim, M. A. Ghazanfar, M. I. Anjum, and I. Begum. 2010. Metagenomics and its application in soil microbial community studies: Biotechnological prospects. J. Anim. Plant Sci. 6:611–622.

Ghidey, F. and E. E. Alberts. 1993. Residue type and placement effects on decomposition: Field study and model evaluation. Trans. ASAE 36:1611–1617. doi:10.13031/2013.28502

Gong, Z., N. Deng, Q. Song, and Z. Li. 2018. Decomposing characteristics of maize straw returning in Songnen Plain in long-time located experiment. Trans. Chin. Soc. Agric. Eng. 34(8):139–145. (in Chinese with English abstract)

Hong, C. Y., K. J. Cheng, T. H. Tseng, C. S. Wang, L. F. Liu, and S. M. Yu. 2004. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. Transgenic Res. 13:29–39. doi:10.1023/b:trag.0000017158.96765.67

Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang, and L. Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:12987–12992. doi:10.1073/pnas.0604882103

Jusoh, M. L. C., L. A. Manaf, and P. A. Latiff. 2013. Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality. Iran. J. Environ. Health Sci. Eng. 10:17. doi:10.1186/1735-2746-10-17

Kanotra, S. and R. S. Mathur. 1994. Biodegradation of paddy straw with cellulolytic fungi and its application on wheat crop. Bioresour. Technol. 47:185–188. doi:10.1016/0960-8524(94)90120-1

Kumar, V., R. R. Bellinder, D. C. Brainard, R. K. Malik, and R. K. Gupta. 2008. Risks of herbicide-resistant rice in India: A review. Crop Prot. 27:320–329. doi:10.1016/j.cropro.2007.05.017

Liu, B. R., G. M. Jia, J. Chen, and G. Wang. 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soils. Pedosphere 16:18–24. doi:10.1016/S1002-0160(06)60021-0

Mislivec, P. B., L. R. Beuchat, and M. A. Cousin. 1992. Yeast and molds. p.239–249. *in*: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed. (Vanderzant, C. and D. F. Splittoesser, eds.) American Public Health Assoc. Washington, DC. 1219 pp.

Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59:695–700. doi:10.1128/aem.59.3.695-700.1993

Nakajima, M., W. Cheng, S. Tang, Y. Hori, E. Yaginuma, S. Hattori, S. Hanayama, K. Tawaraya, and X. Xu. 2016. Modeling aerobic decomposition of rice straw during the off-rice season in an Andisol paddy soil in a cold temperate region of Japan: Effects of soil temperature and moisture. Soil Sci. Plant Nutr. 62:90–98. doi:10.1080/00380768.2015.1121116

Nazari, M. T., B. S. Machado, G. Marchezi, L. Crestani, V. Ferrari, L. M. Colla, and J. S. Piccin. 2022. Use of soil actinomycetes for pharmaceutical, food, agricultural, and environmental purposes. 3 Biotech 12:232. doi:10.1007/s13205-022-03307-y

Nübel, U., F. Garcia-Pichel, M. Kühl, and G. Muyzer. 1999. Quantifying microbial diversity: Morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. Appl. Environ. Microbiol. 65:422–430. doi:10.1128/aem.65.2.422-430.1999

Palys, T., L. K. Nakamura, and F. M. Cohan. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: The role of DNA sequence data. Intl. J. Syst. Bacteriol. 47:1145–1156. doi:10.1099/00207713-47-4-1145

Pan, M., X. Gan, C. Mei, and Y. Liang. 2017. Structural analysis and transformation of biosilica during lignocellulose fractionation of rice straw. J. Mol. Struct. 1127:575–582. doi:10.1016/j.molstruc.2016.08.002

Pan, M., D. Zhou, X. Zhou, and Z. Lian. 2010. Improvement of straw surface characteristics via thermomechanical and chemical treatments. Bioresour. Technol. 101:7930–7934. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.022

Stutzenberger, F. J. 1972. Cellulolytic activity of *Thermo-*

monospora curvata: Optimal assay conditions, partial purification, and product of the cellulase. Appl. Microbiol. 24:83–90. doi:10.1128/am.24.1.83-90.1972

Trülzsch, B., K. Krohn, P. Wonerow, and R. Paschke. 1999. DGGE is more sensitive for the detection of somatic point mutations than direct sequencing. BioTechniques 27:266–268. doi:10.2144/99272bm10

Watanabe, K., M. Teramoto, H. Futamata, and S. Harayama. 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 64:4396–4402. doi:10.1128/aem.64.11.4396-4402.1998

Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore. W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 37:463–464. doi:10.1099/00207713-37-4-463

Wei, X. D., H. L. Zou, L. M. Chu, B. Liao, C. M. Ye, and C. Y. Lan. 2006. Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil. Plant Soil 285:347–358. doi:10.1007/s11104-006-9020-8

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221–271. doi:10.1128/mr.51.2.221-271.1987

Wu, H., S. Chen, L. Zhu, Y. Xu, J. Li, N. Ling, J. Yuan, C. Xue, and Q. Shen. 2024. Identification of antibiotic resistant bacteria communities and a GeoChip based study of resistome in *Fusarium* wilt diseased and healthy soil. Appl. Soil Ecol. 193:105103. Advance online publication. doi:10.1016/j.apsoil.2023.105103

Wu, W., Z. Wang, Y. Jin, Y. Matsumoto, and H. Zhai. 2014. Effects of LiCl/DMSO dissolution and enzymatic hydrolysis on the chemical composition and lignin structure of rice straw. Biomass Bioenergy 71:357–362. doi:10.1016/j.biombioe.2014.09.021

Exploring the Impact of Transgenic Rice Straw Decomposition on Soil Microbial Composition

Cheng-Ping Kuan[1], Ying-Chuan Chiang[2], Chung-Jen Hsiao[2], and Ching-Shan Tseng[1,*]

Abstract

Kuan, C. P., Y. C. Chiang, C. J. Hsiao, and C. S. Tseng. 2023. Exploring the impact of transgenic rice straw decomposition on soil microbial composition. J. Taiwan Agric. Res. 72(4):333–342.

To understand the impact of buried rice straw residues of transgenic rice (AAN), which overexpresses phytase enzymes on the soil microbial community, a year-long monitoring experiment was conducted to track changes in the soil microbial composition. The results revealed that after 180 d of burial, the total bacterial count in the non-transgenic control variety 'TNG 67' (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Tainung 67; 'TNG 67') was significantly higher than that of the AAN transgenic line, and a declining trend was found along with time for both varieties. The total fungal count in the soil exhibited greater variability along with burial time. Although the AAN transgenic line generally had higher fungal counts, the difference between the two was not statistically significant after 120 d of burial. Notably, the total fungal count in the AAN transgenic line decreased significantly at 360 d. Regarding actinomycetes in the soil, the total count gradually increased over time in the 'TNG 67' control rice. However, an obvious increase was found in the AAN transgenic line after 120 d decomposition. Nevertheless, counts of both varieties began to decline after 300 d, and by 360 d, there was no significant difference between the two. Analysis using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) showed an increased abundance of microbial communities near the AAN transgenic line. However, the bacterial communities derived from the AAN transgenic line and 'TNG 67' rice were found in the same cluster with high similarity at 180 d. The same result was found at 360 d in which the AAN transgenic line and 'TNG 67' bacterial communities exhibited similarity within the same cluster. Integrating the results from plate counting and DGGE analysis suggests that during the early stages of straw burial, there were notable differences in microbial count and bacterial diversity between the AAN transgenic line and the 'TNG 67' control. However, these differences gradually diminished or converged after 360 d of burial.

Key Words: Rice, Transgenic crop, Soil bacterial community, Rice straw.

Received: July 25, 2023; Accepted: October 6, 2023.

* Corresponding author, e-mail: samtseng@tari.gov.tw

1 Associate Research Fellows, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

2 Project Assistances, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.